ESTRUTURAS LAMELARES EM RETICULOCITOS

A. BRUNNER JR. E A. VALLEJO-FREIRE

Serviço de Microscopia Eletrônica, Secção de Virulogia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

Introdução

Recentemente têm sido evidenciadas em reticulocitos de mamíferos, algumas das estruturas comuns às demais células, como mitocôndrios (1-6) e retículo endoplasmático agranular (3-6). As ribonucleoproteínas se encontram difusas no citoplasma, o que se evidencia, após coloração pelo Giemsa, pela basofilia uniforme característica. Quando a coloração pelo Giemsa é precedida de tratamento pelo verde Jenus B, resulta uma basofilia reticulada devido à precipitação das ribonucleoproteínas e do corante em tôrno dos mitocôndrios (7). A dissolução dos mitocôndrios, retículo endoplasmático e ribonucleoproteínas, devido à perda de suas funções na síntese de hemoglobina e o aumento da concentração desta, definem o fim do processo de diferenciação da hemácia. Estas observações foram feitas em pacientes com anemia hemolítica, em cobaios e coelhos com anemia provocada por sangrias sucessivas ou por intoxicação plúmbica e em ratos intoxicados com p-dimetilamino-azobenzeno.

É o propósito desta comunicação demonstrar a existência de estruturas semelhantes às constituintes do aparelho de Golgi, em reticulocitos de cobaios com intoxicação plúmbica ou com anemia provocada por sangrias sucessivas.

Material e métodos

Uma reticulocitose em tôrno de 15% foi obtida em cobaios de 350 a 400 g de pêso, por sangrias cardíacas diárias de 4 a 5 ml durante 5 dias, sem que fôssem observados eritroblastos na circulação. Reticulocitoses superiores a 50% foram obtidas em cobaios intoxicados com acetato de chumbo em solução aquosa a 1% por injeções subcutâneas diárias de 1 ml, durante 9 dias.

Em ambos os casos o sangue foi colhido por punção cardíaca ou por corte da unha das patas (8) e fixado imediatamente com OsO_4 a 1% em tampão veronal-acetato, isotônico, de pH 7,4, durante 20 a 30 minutos. À desidratação pela

Recebido para publicação em dezembro de 1962.

série alcoólica seguiu-se a inclusão em butil-metil metacrilatos na proporção de 7:3. As trocas dos meios para a desidratação e inclusão dos glóbulos foram feitas por centrifugações a baixa rotação e decantações sucessivas. Os cortes foram obtidos num micrótomo Porter-Blum e examinados num microscópio Siemens ÜM 100 b com tensão de 60 KV e aumentos de ×7200 e ×15000.

Resultados e discussão

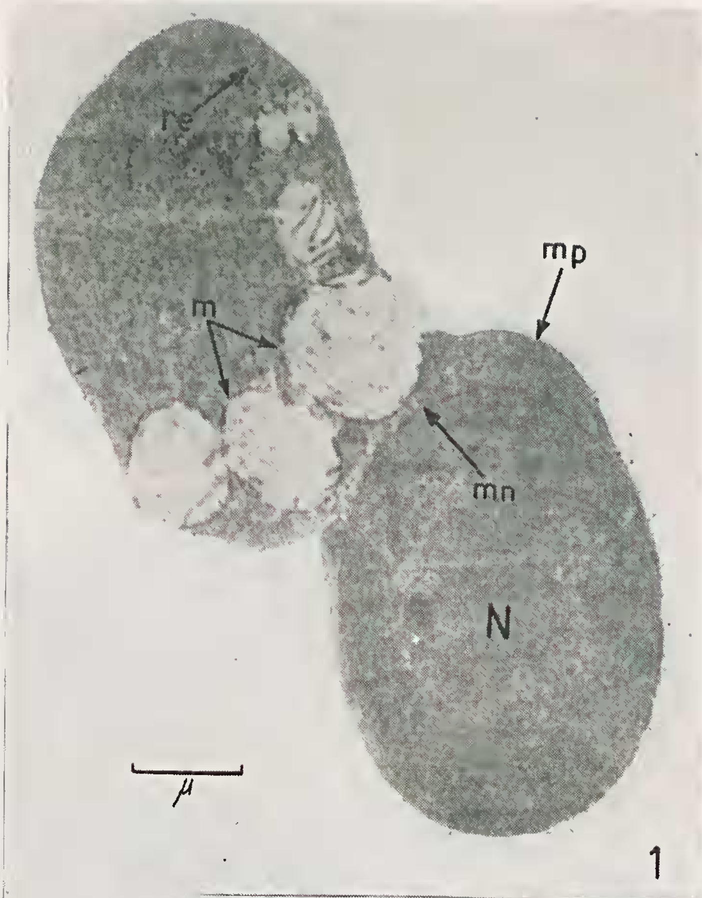
Os eritroblastos possuem tôdas as estruturas somuns às demais células, perdendo o núcleo na fase acidofílica com movimentos ativos executados pelo protoplasma, segundo documentações microcinematográficas feitas por Albrecht (9) e Bessis e Bricka (10). O núcleo, após sofrer deslocamentos devidos às intensas contrações, permanece ligado à célula por meio de um fino cordão citoplasmático, durante alguns minutos, libertando-se em seguida.

Uma das fases dêsse processo pode ser observada no eritroblasto da figura 1, de cobaio com intoxicação plúmbica. Chama a atenção a freqüência com que se observam alguns mitocôndrios próximos à membrana do núcleo em fase de extrusão; em eritroblastos aparentemente não em fase de extrusão nuclear, os mitocôndrios não se dispõem com essa proximidade em relação ao núcleo. A membrana nuclear não possui mais poros, possìvelmente por ter o núcleo perdido sua função. Êste fato pode ser melhor constatado nos cortes tangenciais.

A célula passa assim a constituir um reticulocito, com os elementos citoplasmáticos remanescentes e sofre progressivas transformações ao mesmo tempo que acumula crescentes quantidades de hemoglobina sintetizada. A síntese se processa mais intensamente nêste período da diferenciação, segundo determinações microespectrofotométricas feitas por Seno (4) em eritroblastos e reticulocitos de coelho. Estas alterações podem se evidenciar pela perda das várias estruturas citoplasmáticas e pelo aumento de densidade aos eletrons, transformando-se a célula numa hemácia adulta.

Foram confirmados os achados anteriores em reticulocitos de cobaios com anemia aguda provocada por sangrias sucessivas e de cobaios com intoxicação plúmbica (1-3). Além de mitocôndrios e retículo endoplasmático em fase de involução, foi possível, em alguns reticulocitos jovens, localizar sistemas de membranas com características morfológicas do sistema constituinte do aparelho de Golgi (Fig. 2). A distância entre uma membrana e outra varia, aproximadamente, entre 10 e 18 mμ. Êste sistema de membranas é muito semelhante aos dictiosomos de espermátides de "Helix aspersa" e "Lumbricus terrestris", descritos por Dalton e Felix (11). Não se observam os demais componentes do aparelho de Golgi, vesículas e vacúolos.

Na Fig. 3 a distância entre as membranas é maior, variando de 28 a 40 mμ, dispondo-se algumas vesículas junto ao sistema de membranas. Esta hemácia jovem provàvelmente se encontra numa fase de maturação em que tem início o



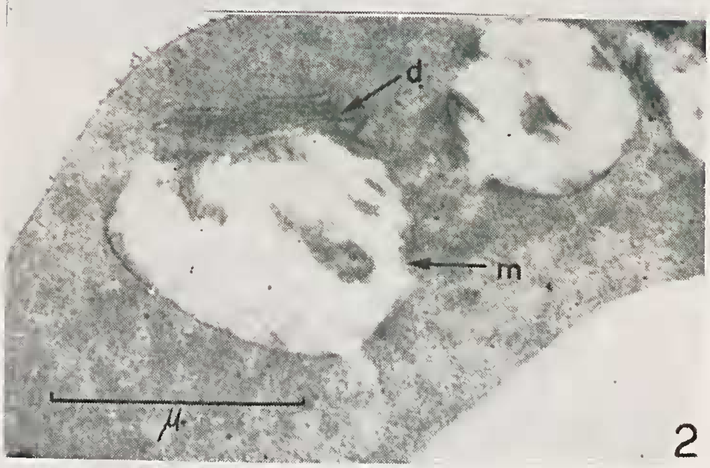


Fig. 1 — Erythroblast of guinea-pig with lead poisoning; N — nucleus in phase of extrusion; m — mitochondria; re — endoplasmic reticulum; mp — plasma membrane; mn — nuclear membrane.

Reticulocytes of guinea-pigs with lead poisoning.

Fig. 2 — Reticulocytes of guinea-pigs with lead poisoning. Dictiosome (d) disposed near a mitochondria (m) of enlarged volume and disorganized trabecular structure.

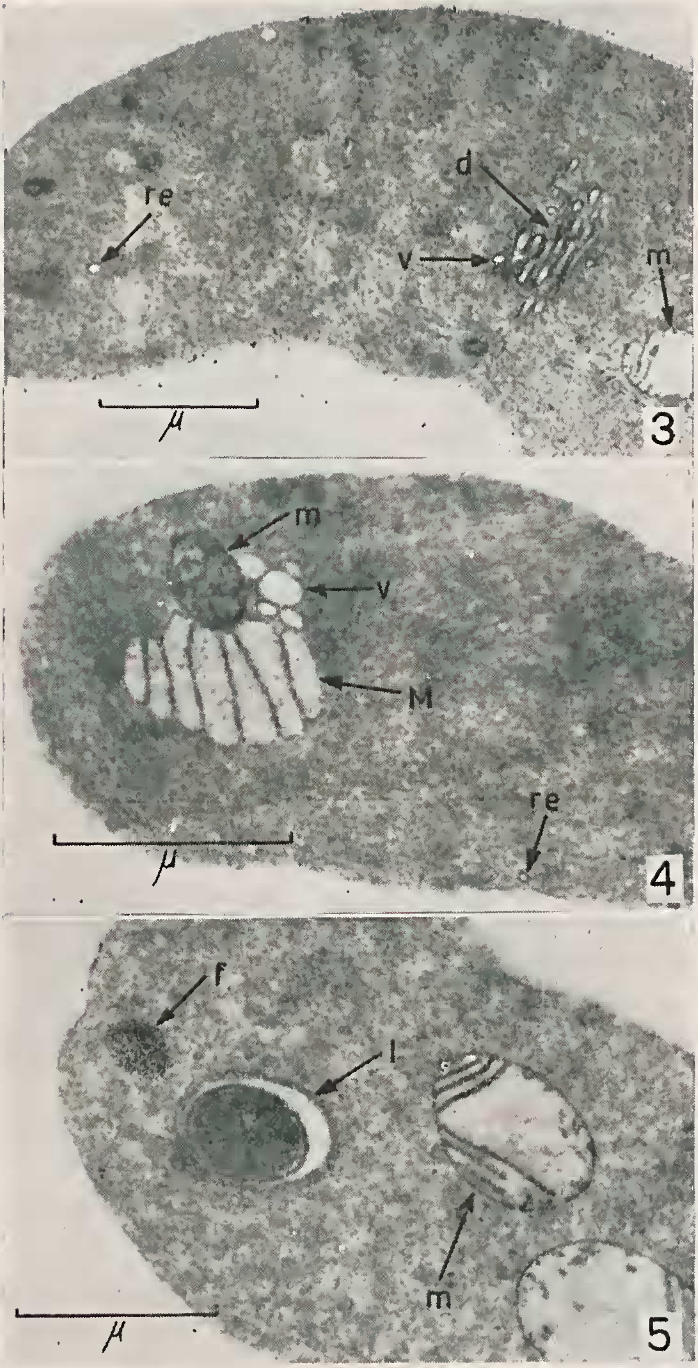


Fig. 3 — Reticulocytes of guinea-pigs with lead poisoning — d — dictiosome; v — vesicles; m — mitochondria; re — endoplasmic reticulum.

Fig. 4 — Reticulocyte of guinea-pig with anemia caused by successive bleedings, containing a system of membranes (M), vesicles (v) and a mitochondria (m); re — endoplasmic reticulum. The density to the electrons is accented due to the concentration of hemoglobin already synthetized.

Fig. 5 — Reticulocyte of guinea-pig with lead poisoning containing a structure constituted of concentric lamellae (l) of elliptic section; m — mitochondria; f — ferritine.

processo de reabsorção ou dissolução dos seus constituintes estruturais (3), como se pode observar no mitocôndrio com membrana limitante e trabéculas, incompletas.

Seno, Kawai e Nishikawa (12) verificaram que na intoxicação plúmbica o período de maturação do reticulocito é maior que o normal bem como o número de células degeneradas irrecuperáveis. Êstes dois fatôres aumentaram a probabilidade de surpreender aquelas estruturas, desde a fase de atividade até a de dissolução gradativa. Vallejo-Freire e Brunner (3) verificaram que as estruturas membranosas dêsses reticulocitos se mostravam mais contrastadas em comparação com o normal. Êste fato pode ser explicado admitindo-se ter havido uma impregnação pelo chumbo, "fixando-as", total ou parcialmente, dependendo da fase do período de intoxicação, ou seja, do maior ou menor teor de chumbo na circulação.

A observação de que a região que circunda o vacúolo contrátil de certos protozoários reduz o ácido ósmico, da mesma maneira do que ocorre com o aparelho de Golgi das células de vertebrados, levou Nassonov (13) a sugerir a existência de uma homologia entre as duas estruturas. Esta observação foi confirmada em exames eletromicroscópicos de protozoários e espongiários, por Gatenby, Dalton e Felix (14). A homologia aparente entre estas estruturas implica na participação do aparelho de Golgi no contrôle do equilíbrio osmótico das células. A concentração de sódio, potássio, cálcio e fósforo nos reticulocitos é maior do que nas hemácias adultas (15-17) e o teor em água é de cêrca de 5% maior que o dos eritrocitos (18, 19). Durante o processo de maturação aquêles solutos diminuem portanto, em concentração, do que resulta a necessidade de perda de água da hemácia para manter o equilíbrio osmótico em relação ao plasma. Pode-se conjecturar sôbre a possibilidade das estruturas descritas no reticulocito possuirem uma função ativa nêsse sentido. No reticulócito da Fig. 4, de cobaio com anemia provocada por sangrias sucessivas, o espaço entre as membranas do sistema de Golgi varia ao redor de 120 mμ, observando-se algumas vesículas próximas ao sistema. O fato dêsse reticulocito conter ainda remanescentes do aparelho de Golgi, embora já apresente uma elevada densidade aos eletrons, devido ao conteúdo em hemoglobina, sugere que êste sistema de membranas tem uma função ainda na fase anucleada, pré-adulta. Os "corpos nucleares" descritos por Golgi (20) em hemácias adultas, humanas e de outros animais, não correspondem a estas estruturas que existem sòmente nas hemácias jovens, ainda em fase de diferenciação; o glóbulo vermelho maturo não possui no seu interior nenhuma estrutura corpuscular.

Estruturas lamelares reticulares, concêntricas e espiraladas têm sido descritas em mielocitos basófilos (21), epitélio do tubo contornado proximal de camundongos (22) e células L-60 em culturas de tecido (25) e em epitélio branquial de salamandra (24), respectivamente. A função dessas estruturas não é conhecida. A estrutura lamelar do reticulocito da Fig. 5, assemelha-se às lamelares concêntricas descritas. As lamelas se dispõem de modo a dar uma secção elíptica ao conjunto, tendo as mais periféricas se destacado num dos polos da elipse, ou as internas sofrido uma retração.

Resumo

Em reticulocitos de cobaios normais ou com intoxicação plúmbica, são descritas estruturas lamelares semelhantes aos dictiosomos constituintes do aparelho de Golgi. Uma estrutura lamelar concêntrica, descrita em vários tipos de células, de função desconhecida, é também apresentada.

Trabalho executado com o auxílio do Fundo de Pesquisas do Instituto Butantan.

Summary

In reticulocytes of normal guinea-pigs or with lead poisoning, lamellar structures similar to the dictiosomes which constitute the Golgi apparatus, are described. A concentric lamellar structure of unknown function, described in several kinds of cells, is also presented.

Bibliografia

1. *Brunner Jr., A., Vallejo-Freire, A.* and *Souza Santos, P.* — *Experientia*, **12**:255, 1956.
2. *Braunsteiner, H., Fellinger, K.,* und *Pakesch, F.* — *Acta Haemat.*, **16**:322-328, 1956.
3. *Vallejo-Freire, A.* e *Brunner Jr., A.* — *Mem. Inst. Butantan*, **28**:245-266, 1957/58.
4. *Seno, S.* — *Acta Haemat. Japon.*, **21**:351-361, 1958.
5. *Seno, S., Yoshizawa, K., Nakamoto, T.* and *Kanda, S.* — *Folia Haemat.*, **2**:269-279, 1958.
6. *Wainrach, S.* — *Anales Fac. Med.*, **44**:488-492, 1959.
7. *Brunner Jr., A.* — *Mem. Inst. Butantan* (no prelo).
8. *Vallejo-Freire, A.* — *Science*, **114**:524-525, 1951.
9. *Albrecht, M.* — *Acta Haemat.*, **6**:83-91, 1951.
10. *Bessis, M.* et *Bricka, M.* — *Rev. Hemat.*, **7**:497-535, 1952.
11. *Dalton, A. J.* and *Felix, M. D.* — *J. Biophysic. Biochem. Cytol.*, Suppl., **2**:79-84, 1956.
12. *Seno, S., Kawai, K.* and *Nishikawa, K.* — *Mie Medical J.*, Suppl. 1, **4**:19-34, 1953.
13. *Nassonov, D. N.* — Citado por A. J. Dalton *in The Cell*, vol. II, p. 605, 1961.
14. *Catenby, J. B., Dalton, A. J.* and *Felix, M. D.* — *Nature*, **176**:301-302, 1955.
15. *Kay, H. D.* — *Brit. J. Exptl. Pathol.*, **11**:148-152, 1930.
16. *Rapoport, S., Guest, G. M.* and *Wing, M.* — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **57**:344-347, 1944.
17. *Kruszynski, J.* — *Acta anat.*, **24**:164-171, 1955.
18. *Gaffney, M.* — *Brit. J. Haemat.*, **3**:311-319, 1957.
19. *Lowenstein, L. M.* — Tese de doutoramento citada em *Intern. Rev. Cytol.*, vol. VIII, p. 149, 1959.
20. *Golgi, C.* — *Haematologica*, **1**:1-16, 1920.
21. *Pease, D. C.* — *Blood*, **11**:501-526, 1956.
22. *Clark, S. L.* — *J. Biophysic. Biochem. Cytol.*, **3**:349-362, 1957.
23. *Dales, S.* and *Siminovitch, L.* — *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **10**:475-504, 1961.
24. *Schultz, H.* und *de Paola, S. D.* — Citado com documentação original por H. Kurozumi *in Intern. Rev. Cytol.*, vol. XI, p. 32 e 33, 1961.